

ISBN: 978-84-938046-4-0

DETERMINACIÓN DE HORMONAS ESTEROIDEAS EN AGUAS DEPURADAS DE LA ISLA DE GRAN CANARIA

Rayco GUEDES ALONSO, Zoraida SOSA FERRERA y José Juan SANTANA RODRÍGUEZ

Departamento de Química. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. 35017. Las Palmas de Gran Canaria, España. rayco.guedes@ulpgc.es

RESUMEN

La comunidad científica internacional ha mostrado su preocupación en las últimas décadas sobre la presencia de hormonas esteroideas en el medio ambiente, las cuales han sido catalogadas como "compuestos disruptores endocrinos" (EDCs). Las hormonas pueden llegar al medio a través de diferentes vías, siendo la fuente principal la descarga al medio de los efluentes de las estaciones depuradoras de aguas residuales (EDARs), debido a la eliminación incompleta de estos compuestos que se produce en ellas. Las concentraciones de hormonas presentes en el medio acuático suelen ser del orden de $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$, por lo que se necesitan metodologías analíticas sensibles y selectivas para su determinación. La extracción en fase sólida, combinada con cromatografía líquida de alta o ultra resolución, cumple estas condiciones por lo que se ha elegido este proceso para realizar la extracción, preconcentración y determinación de estos compuestos en aguas residuales. En el presente trabajo se determinan 15 hormonas, pertenecientes a cuatro familias de hormonas esteroideas, mediante extracción en fase sólida y cromatografía líquida de ultra resolución con detección de espectrometría de masas (SPE-UHPLC-MS/MS), presentes en muestras de aguas residuales de entrada y salida de estaciones depuradoras de la isla de Gran Canaria.

Palabras clave: *Hormonas, Extracción en Fase Sólida, Cromatografía Líquida, Aguas residuales.*

ABSTRACT

For the last decades, the scientific community has noticed the presence of steroid hormones in the environment which has been classified as "endocrine disrupting compounds" (EDCs). Hormonal compounds could reach the Environment through different ways, but the principal way is through the effluents of the wastewater treatment plants (WWTPs), due to the incomplete removal of the compounds in them. The hormone concentrations present in aquatic environment are about $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ so it is necessary the develop of sensible and selective analytical methods for its determination. Solid phase extraction coupled with high or ultra-high performance liquid chromatography is appropriate for this analysis. For this reason, this methodology has been chosen for the extraction, preconcentration and determination of hormonal compounds in wastewater. In this work, the determination of 15 hormonal compounds from all the subfamilies of hormones using solid phase extraction coupled with high or ultra-high performance liquid

chromatography with mass spectrometry detection in tandem (SPE-UHPLC-MS/MS) is shown. This method allows the determination and quantification of hormonal compounds in influent and effluent waters from wastewater treatment plants of Gran Canaria Island (Spain).

Key words: *Hormones, Solid Phase Extraction, Liquid Chromatography, Wastewaters*

INTRODUCCIÓN

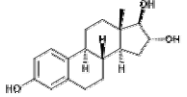
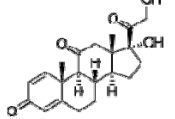
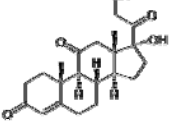
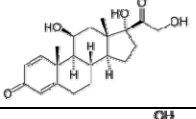
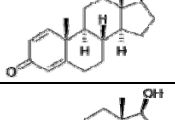
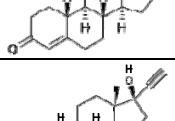
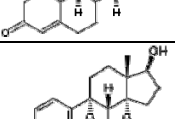
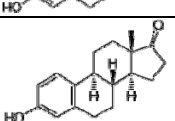
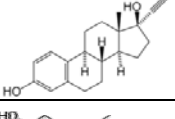
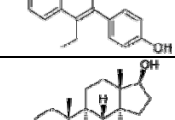
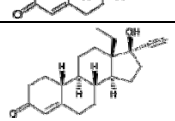
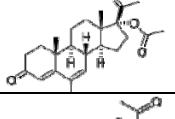
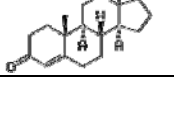


El desarrollo del mundo moderno ha llevado consigo una importante industrialización y una gran producción, que han hecho que aumente la preocupación por el Medio Ambiente y el desarrollo sostenible. Desde esta perspectiva, es preciso suministrar información con un nivel de calidad suficiente para evaluar el estado de éste. En general, podemos suponer que más de 100.000 compuestos químicos diferentes pueden entrar en el Medio Ambiente, muchos de ellos en cantidades muy pequeñas. Muchos de estos compuestos no están recogidos en la legislación como contaminantes. Son los denominados contaminantes emergentes, que causan efectos sobre el ecosistema. Estos contaminantes emergentes son compuestos que, aunque aún no están regulados como contaminantes, son firmes candidatos a estarlo en el futuro, dependiendo de la investigación sobre sus potenciales efectos tóxicos y de los datos disponibles que puedan demostrar su existencia.

Las hormonas esteroideas son un grupo de compuestos dentro de los contaminantes emergentes, las cuales se suelen clasificar en diferentes subgrupos como son los glucocorticoides, andrógenos, estrógenos y progestágenos (Tabla 1). Las hormonas esteroideas ayudan al control del metabolismo, inflamación, funciones inmunológicas, equilibrio de sal y agua, desarrollo de las características sexuales y capacidad de resistir enfermedades (Ying et al., 2002). El término esteroide describe tanto las hormonas naturales producidas por el cuerpo así como a los medicamentos producidos artificialmente que duplican la acción de los esteroides naturales. Las hormonas esteroideas, tanto naturales como artificiales, excretadas diariamente, alcanzan el medio a través de los efluentes de las estaciones depuradoras de aguas residuales (EDARs), por lo que muchos autores han determinado que las EDARs son la principal fuente de contaminación del medio acuático por hormonas (Stafiej et al., 2007; Robinson et al., 2007). Esta contaminación se debe a la estabilidad, resistencia a la degradación microbiana y biodisponibilidad de los compuestos hormonales (Lange et al., 2002).

El hecho de que las hormonas esteroideas sean consideradas contaminantes emergentes se debe a que diversos estudios, desde los desarrollados por Jobling y Sumpter a principios de los años 90, han determinado efectos tóxicos sobre organismos acuáticos. Estos efectos comprenden cambios fisiológicos en peces, producidos por la presencia de estrógenos (Sumpter & Jobling, 1995), disminución de la reproducción de peces como el “zebra fish” (Colman et al., 2009) o cambios de niveles de vitelogenina en organismos marinos expuestos a concentraciones de 1 ng·L⁻¹ de estradiol (Hansen et al., 1998).

El objetivo de este trabajo es la determinación de 15 hormonas, pertenecientes a cuatro familias de hormonas esteroideas, mediante extracción en fase sólida y cromatografía líquida de ultra resolución con detección de espectrometría de masas (SPE-UHPLC-MS/MS), presentes en muestras de aguas residuales de entrada y salida de estaciones depuradoras de aguas residuales de la isla de Gran Canaria, con diferentes tratamientos.

Tabla 1. Nombre y acrónimos de los compuestos hormonales estudiados, así como valores de pKa, estructura química y tiempo de retención.

Compuesto	pK _a (Scifinder Database)	Estructura	t _R (min)	
E3	Estriol	10.3		2.12
PRED	Prednisone	12.4		2.29
COR	Cortisone	12.4		2.32
PREDNL	Prednisolone	12.5		2.45
BOL	Boldenone	15.1		2.87
NAN	Nandrolone	15.1		2.93
NORET	Norethisterone	13.1		2.95
E2	17β-estradiol	10.3		2.97
E1	Estrone	10.3		2.99
EE	17α-ethynilestradiol	10.3		3.00
DES	Diethylstilbestrol	10.2		3.02
TES	Testosterone	15.1		3.15
NORG	Norgestrel	13.1		3.29
MGA	Megestrol acetate	--		3.54
PRO	Progesterone	--		3.71

METODOLOGÍA

Reactivos

Todos los compuestos hormonales presentan una pureza superior al 95% y son de la marca Sigma-Aldrich (Madrid, España). Se prepararon disoluciones patrón de $1000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de cada compuesto, así como una mezcla de todos los compuestos a una concentración de $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, las cuales fueron guardadas a -20°C . A partir de estas disoluciones patrón se realizaron diariamente las de trabajo. El agua ultra-pura utilizada se obtuvo a partir de un sistema Milli-Q de Millipore (Bedford, EEUU). El metanol calidad HPLC, calidad LC-MS, agua LC-MS, así como el amoniaco utilizado para regular el pH de la fase móvil se obtuvieron de Panreac Química (Barcelona, España)

Toma de muestras

Las muestras se tomaron en el influente y el efluente de dos estaciones depuradoras de aguas residuales (EDAR) situadas en el norte de la isla de Gran Canaria en los meses de mayo y agosto de 2012 y mayo de 2013. La EDAR1 utiliza un método de lodos activos como sistema de depuración, mientras que la EDAR2 presenta un tratamiento de biorreactor de membrana. Las muestras fueron tomadas en botellas de vidrio ámbar de 2 L, lavadas previamente con agua ultrapura y metanol. Una vez en el laboratorio, las muestras se filtraron a través de filtros de membrana de $0,65 \mu\text{m}$ precedidos de un prefiltro de fibra de vidrio (Millipore, Irlanda) y se guardaron en oscuridad a 4°C hasta el momento de ser extraídas.

Instrumentación

Las muestras han sido analizadas en un sistema de cromatografía líquida de ultra-resolución, con detección de espectrometría de masas en tándem (UHPLC-MS/MS) de la marca Waters (Barcelona, España) formado por una bomba binaria (BSM) utilizada para impulsar la fase móvil, un autosampler modelo 2777 equipado con una jeringa de $25 \mu\text{L}$ y una bandeja de muestras de viales de 2 mL y un detector de espectrometría de masas de triple cuadrupolo (TQD) con interfase de ionización por electrospray (ESI). Todos estos módulos se controlan a través del software Masslynx 5.1, suministrado también por la compañía Waters (Barcelona, España). Los parámetros de la ionización por electrospray son los siguientes: voltaje de capilar de 3 kV en modo positivo y -2 kV en modo negativo, 150 y 500°C de temperatura de la fuente y de desolvatación, respectivamente y nitrógeno como gas de desolvatación a un flujo de $1000 \text{ L}\cdot\text{hr}^{-1}$. Como gas de colisión se utilizó argón a un flujo de $50 \text{ mL}\cdot\text{hr}^{-1}$.

Las masas utilizadas para la identificación y determinación de cada uno de los compuestos hormonales se presentan en la Tabla 2. Estos parámetros fueron optimizados inyectando directamente en el detector una disolución patrón de cada compuesto individualmente a una concentración de $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ a un flujo de $20 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. Así se optimizaron variables como los diferentes iones precursores, los voltajes de cono, los distintos iones “hijos” o de fragmentación y los potenciales de colisión correspondientes.

Condiciones cromatográficas

La columna utilizada ha sido una ACQUITY UPLC BEH C_{18} de $50 \times 2,1 \text{ mm}$ y tamaño de partícula de $1,7 \mu\text{m}$ de Waters (Barcelona, España) a una temperatura de 35°C . Para la separación cromatográfica de los compuestos se utilizó agua con un 0,1% de amoniaco y metanol sin aditivos con el siguiente gradiente: comienzo a 50:50 de mezcla agua:metanol, cambio a 25:75 en 3 minutos, vuelta a las condiciones iniciales en 1 minuto y reequilibrio de

la presión del sistema durante 1,5 minutos más. El flujo de fase móvil fue de $0,3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ y el volumen de inyección fue de $5 \mu\text{L}$.

Tabla 2. Parámetros del detector de espectrometría de masas para la determinación de los compuestos hormonales de estudio.

Compuesto	Ion precursor, m/z	Voltaje de cono (Modo de ionización)	Ion de cuantificación, m/z (potencial de colisión)	Ion de confirmación, m/z (potencial de colisión)
E3	287.2	-65 V (ESI -)	171.0 (37V)	145.2 (39V)
PRED	359.3	30 V (ESI +)	147.0 (15V)	237.0 (20V)
COR	361.3	30 V (ESI +)	163.0 (25V)	121.0 (45V)
PREDNL	361.3	20 V (ESI +)	147.1 (20V)	173.1 (25V)
BOL	287.2	30 V (ESI +)	121.0 (28V)	135.1 (15V)
NAN	275.2	35 V (ESI +)	109.1 (20V)	83.0 (30V)
NORET	299.2	30 V (ESI +)	109.1 (25V)	91.0 (40V)
E2	271.2	-65 V (ESI -)	145.1 (40V)	183.1 (31V)
E1	269.2	-65 V (ESI -)	145.0 (36V)	143.0 (48V)
EE	295.2	-60 V (ESI -)	145.0 (37V)	158.9 (33V)
DES	267.1	-50 V (ESI -)	237.1 (29V)	251.1 (25V)
TES	289.2	38 V (ESI +)	97.0 (22V)	104.0 (21V)
NORG	313.2	38 V (ESI +)	109.0 (26V)	245.1 (18V)
MGA	385.5	30 V (ESI +)	267.3 (15V)	224.2 (30V)
PRO	315.3	30 V (ESI +)	97.0 (18V)	109.1 (25V)

Extracción de los analitos

Como método de extracción se ha utilizado la extracción en fase sólida (SPE por sus siglas en inglés) con cartuchos Sep-Pak C₁₈ de Waters (Barcelona, España). Las condiciones óptimas de extracción son: 250 mL de muestra a pH = 8 y 0% de adición de NaCl, paso de lavado de 5 mL de agua Milli-Q y desorción con 2 mL de metanol. Estas condiciones se han obtenido como óptimas en el desarrollo del método de extracción publicado por Guedes-Alonso et al., 2013.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Parámetros analíticos

Para determinar los parámetros analíticos del método, así como para cuantificar las concentraciones en las muestras reales se realizaron curvas de calibrado diluyendo la disolución patrón en concentraciones de entre 1 y $100 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$. Una vez obtenidas las áreas de cada concentración para cada compuesto, se realizaron las rectas de calibración correspondientes, obteniéndose coeficientes de regresión lineal satisfactorios ($r^2 > 0,99$)

Los límites de detección (LD) y cuantificación (LC) de cada compuesto se calcularon utilizando la relación entre la señal y el ruido de fondo. Una relación igual a 3 fue definida como límite de detección, mientras que la relación igual a 10 se escogió como límite de cuantificación. Los LDs obtenidos se situaron en el rango de $0,15$ a $9,35 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$, mientras que los LCs obtenidos variaron entre $0,49$ y $31,18 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$.

La calidad y fiabilidad del método analítico se comprobaron determinando la repetibilidad del proceso analítico así como los porcentajes de recuperación del proceso de extracción, utilizando 6 muestras ($n=6$). Para la repetibilidad se calculó la desviación estándar relativa (RSD) para cada compuesto, las cuales estuvieron siempre por debajo del 8,4%. En cuanto a los porcentajes de recuperación, fueron variables dependiendo de la matriz, pero

superiores al 70% en la mayoría de los casos.

Análisis de hormonas en aguas residuales.

El método desarrollado se aplicó a muestras de agua residual procedentes de dos estaciones depuradoras de aguas residuales (EDARs) de la isla de Gran Canaria que emplean diferentes tratamientos. La denominada EDAR1 utiliza un sistema de tratamiento clásico de lodos activados, mientras que la EDAR2 emplea un método de depuración basado en un biorreactor de membrana. Una vez analizadas las muestras obtenidas en mayo y agosto de 2012 y mayo de 2013, se determinó la concentración de los compuestos detectados. Dichas concentraciones vienen reflejadas en la Figura 1.

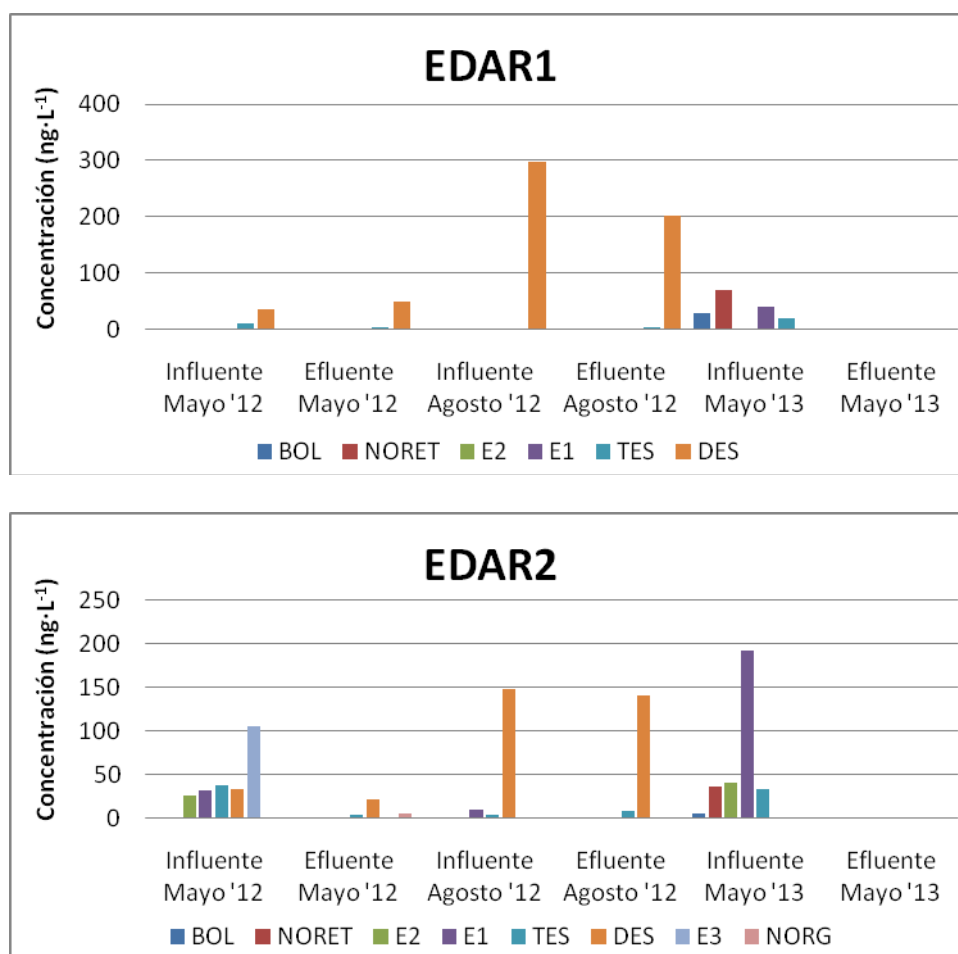


Figura 1. Concentraciones detectadas de hormonas en las estaciones depuradoras de estudio.

Se puede comprobar que en la EDAR1 se detectan menos compuestos, aunque, normalmente, en concentraciones por encima de $50 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$. Por el contrario, en la EDAR2, se detectan compuestos que no se detectan en la EDAR1, como el 17β -estradiol, el estriol o el norgestrel, pero las concentraciones detectadas son más bajas. Rara vez se supera en esta depuradora el valor de $50 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ para algún compuesto, excepto para el estriol en el influente del primer muestreo, el dietilestilbestrol en las muestras del segundo o la estrona en el influente del tercer muestreo. Comprobamos además que existe gran variabilidad entre muestreos, debido principalmente a la complejidad de las muestras.

En cuanto a la eliminación de este tipo de compuesto por parte de las tecnologías usadas en cada EDAR, se pueden ver algunas tendencias, aunque sería necesario aumentar el

número de muestreos para determinar una eliminación real. En la EDAR1 se produce una eliminación superior al 88% para todos los compuestos, excepto para el dietilestilbestrol, que presenta una baja eliminación en el segundo muestreo y un aumento de la concentración durante la depuración en el primero. En la EDAR2 ocurre algo parecido, pues todos los compuestos detectados en el primer muestreo se eliminan totalmente o sus concentraciones son más bajas, con excepción del norgestrel, aunque su concentración en el efluente es de menos de $10 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$. En esta EDAR el dietilestilbestrol si se elimina parcialmente (entre un 5 y un 34%) y sólo aumenta la concentración de testosterona en el segundo muestreo, que pasa de $3,5 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ en la muestra de entrada a casi $8 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ en el efluente. Finalmente, hay que destacar que en ambas depuradoras se produce una buena eliminación de los compuestos hormonales en el tercer muestreo al detectarse concentraciones de compuestos hormonales sólo en la muestra de influente de ambas.

CONCLUSIONES

Se ha desarrollado un método analítico para determinar compuestos hormonales en aguas residuales procedentes de la isla de Gran Canaria. El método es sensible, reproducible, con límites de detección y de cuantificación en el rango de $0,15$ a $9,35 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$, y $0,49$ y $31,18 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente, adecuados para el estudio de este tipo de contaminantes emergentes en el medio acuáticos. Una vez desarrollado, el método se utilizó para determinar compuestos hormonales en muestras de influente y efluente de dos estaciones depuradoras de aguas residuales que utilizan diferentes tecnologías de depuración.

En ambas EDARs se detectaron diversos compuestos hormonales (hasta 5 diferentes en la EDAR1 y hasta 8 diferentes en la EDAR2) en concentraciones normalmente inferiores a $50 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$, aunque en algunos casos las concentraciones para compuestos como el dietilestilbestrol, la estrona o el estriol, fueron más altas, llegando hasta casi $300 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$. En cuanto a la eliminación de los compuestos, se produce una alta eliminación de los compuestos hormonales durante el proceso de depuración, excepto para algunos compuestos como el dietilestilbestrol.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado con fondos del Ministerio de Ciencia y Tecnología dentro del proyecto de Investigación con referencia CTQ-2010-20554. Asimismo, Rayco Guedes Alonso agradece a la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria por su beca Predoctoral, dentro de la cual se llevó a cabo este trabajo.

REFERENCIAS

- Colman, J.R.; Baldwin, D.; Johnson, L.L. y Scholz, N.L. (2009). *Effects of the synthetic estrogen, 17 α -ethinylestradiol, on aggression and courtship behavior in male zebrafish (Danio rerio)*. Aquatic Toxicology 91: 346-354
- Guedes-Alonso, R.; Sosa-Ferrera, Z.; Santana-Rodríguez, J.J. (2013). *Simultaneous Determination of Hormonal Residues in Treated Waters Using Ultrahigh Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry*. Journal of Analytical Methods in Chemistry 2013: 210653
- Hansen, P.-D.; Dizer, H.; Hock, B.; Marx, A.; Sherry, J.; McMaster, M. y Blaise, C. (1998). *Vitellogenin – a biomarker for endocrine disruptors*. Trends in analytical chemistry 17: 448-451

- Lange, I.G.; Daxenberger, B.; Schiffer, B.; Witters, H.; Ibarreta, D. y Meyer, H.H.D. (2002). *Sex hormones originating from different livestock production systems: fate and potential disrupting activity in the environment*. *Analytica Chimica Acta* 473: 27-37
- Robinson, I.; Junqua, G.; Coillie, R.V. y Thomas, O. (2007). *Trends in the detection of pharmaceutical products, and their impact and mitigation in water and wastewater in North America*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 387: 1143-1151
- Scifinder; Chemical Abstracts Service: Columbus, OH; pKa; <https://scifinder.cas.org> (accessed November, 2014); calculated using Advanced Chemistry Development (ACD/Labs) Software V11.02. 1994-2013
- Stafiej, A.; Pyrzynska, K. y Regan, F. (2007). *Determination of anti-inflammatory drugs and estrogens in water by HPLC with UV detection*. *Journal of Separation Science* 30: 985-991
- Sumpter, J.P. y Jobling, S. (1995). *Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment*. *Environmental Health Perspectives* 103: 173-178
- Ying, G.G.; Kookana, R. y Ru, Y.J. (2002). *Occurrence and fate of hormone steroids in the environment*. *Environment International* 28 (6): 545-551.